

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-182483  
(43)Date of publication of application : 07.07.1998

---

(51)Int.Cl. A61K 39/012  
C07K 14/455  
// C12P 21/08

---

(21)Application number : 08-359098 (71)Applicant : SUMITOMO PHARMACEUT CO LTD  
(22)Date of filing : 26.12.1996 (72)Inventor : NAKAI YUTAKA

---

(54) COCCIDIUM ANTIGEN AND VACCINE FOR COCCIDIOSIS

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a coccidium antigen useful as a vaccine for coccidiosis by using a glycopeptide obtained by extracting oocyst of *Eimeria tenella* and having an inducing ability for immune response against poultry coccidiosis.

SOLUTION: This coccidium antigen comprises a glycopeptide obtained by extracting oocyst of *Eimeria tenella*, having 25kD molecular weight in SDS- PAGE (under reduced condition) and 3.68 isoelectric point and further having an inducing ability of immune response against poultry coccidiosis. The objective antigen is preferably obtained by purifying an extract derived from oocyst of *Eimeria tenella* by an affinity chromatography having a monoclonal antibody recognizing the surface antigen of sporozoite bonded to the affinity chromatography. The monoclonal antibody is preferably a monoclonal KC-1 antibody produced by a hybridoma of FERM P-15954.

---

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-182483

(43) 公開日 平成10年(1998)7月7日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>  
A 6 1 K 39/012  
C 0 7 K 14/455  
// C 1 2 P 21/08

識別記号  
AFH

F I  
A 6 1 K 39/012  
C 0 7 K 14/455  
C 1 2 P 21/08

AFH

審査請求 未請求 請求項の数 5 FD (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願平8-359098

(22) 出願日 平成8年(1996)12月26日

(71) 出願人 000183370

住友製薬株式会社

大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

(72) 発明者 中井 裕

宮城県仙台市泉区南光台3丁目28-4

(74) 代理人 弁理士 細田 芳徳

(54) 【発明の名称】 コクシジウム抗原及びコクシジウム症ワクチン

(57) 【要約】

【課題】 コクシジウム症ワクチンとして有用な、アイメリア テネラのオーシストより精製される抗原、該抗原を含むワクチン及び該ワクチンを使用して、コクシジウム症に対して免疫応答を誘導する方法を提供すること。

【解決手段】 アイメリア テネラ (*Eimeria tenella*) のオーシストから抽出され得る、S D S - P A G E (還元下) での分子量が 25 kDa で、等電点が 3.68 である、鶏のコクシジウム症に対する免疫応答の誘導能を有する糖ペプチドからなる抗原、該抗原を含むワクチン及び該ワクチンの免疫学的有効量を鶏に投与することを特徴とする、鶏のコクシジウム症に対して免疫応答を誘導する方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 アイメリア テネラ (*Eimeria tenella*) のオーシストから抽出され得る、SDS-PAGE (還元下) での分子量が 25 kDa で、等電点が 3.68 である、鶏のコクシジウム症に対する免疫応答の誘導能を有する糖ペプチドからなる抗原。

【請求項2】 スポロゾイトの表面抗原を認識するモノクローナル抗体の結合したアフィニティクロマトグラフィーにより精製される、請求項1記載の抗原。

【請求項3】 該モノクローナル抗体が、FERM P-15954 のハイブリドーマにより產生されるモノクローナル K C - 1 抗体である請求項2記載の抗原。

【請求項4】 請求項1～3いずれかに記載の抗原を含むワクチン。

【請求項5】 請求項4記載のワクチンの免疫学的有効量を鶏に投与することを特徴とする、鶏のコクシジウム症に対して免疫応答を誘導する方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、家畜、特に鶏におけるコクシジウム症のためのワクチンとして利用可能な抗原、該抗原を含むワクチン及び該ワクチンを使用する方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 近年、我国の養鶏産業は、機械化、省略化により急速な発展を遂げてきた。1994年で既に、国内で採卵鶏が1億4400万羽、ブロイラーが1億4000万羽飼養されており、1戸当たりの平均飼養羽数は採卵鶏が16000羽、ブロイラーが30000羽となっている。このように、鶏の飼養環境は大規模かつ高密度になっており、常に疾病の蔓延の危険性をはらんでいると言える。古くから鶏疾病の1つとして、ニワトリコクシジウム症が知られているが、この疾病に罹病すると、極度の増体効果の低下、死亡がおこりかなりの経済的損失をまねく。全世界で年間数億ドルもの抗コクシジウム剤が消費されていると言われており、この疾病に対する深刻さを物語っている。またこれらの薬剤の鶏卵や鶏肉への残留による食品汚染や、糞を介しての環境汚染といった問題も心配されている。

【0003】 ニワトリコクシジウム症を発症させる原虫は、アピコンプレクス門、胞子虫綱、コクシジウム亜綱、真コクシジウム目、アイメリア亜目、アイメリア科に属するアイメリア種 (*Eimeria*) である。それぞれの種は好寄生部位をもち、複雑な生活環をもっている。現在確認されているアイメリア種は9種で、日本でよく確認される種は、アイメリア アセルブリナ (*E. aceruvulina*)、アイメリア テネラ (*E. tenella*)、アイメリア ネカトリックス (*E. necatrix*) 及びアイメリア マキシマ (*E. maxima*) であり、ニワトリコクシジウム症は、これらの混合感染によるものがほぼ半数を占める (及川

弘、ニワトリコクシジウム症の病態生理学、土山印刷、p. 1-215、1976)。またコクシジウム症には、急性コクシジウム症と慢性コクシジウム症とが存在する。急性症状を起こすものとしては、アイメリアテネラ、アイメリア ネカトリックス、慢性症状を起こすものとしては、アイメリア アセルブリナ、アイメリア マキシマが知られている。通常、慢性コクシジウム症は症状のみを示し、それを発症させる原虫の生活環は、急性のものより短い期間で終了する。

【0004】 アイメリアに感染したヒナは、症状が重症であれば死亡するが、回復したヒナは、感染から約1週間に後に抗体産生が起こり、次回からの感染に抵抗性を示すことが知られている。一般的にアイメリアの種ごとで免疫反応性は異なっており、アイメリア マキシマは免疫原性が高く、多種に比べて比較的長く、高いレベルで免疫反応が持続することが知られている (Long, Rose, Parasitology 65 (3) : 437-445, 1972)。これと比較して、アイメリア テネラは、免疫成立が遅い種であり、オーシストの生産を完全に抑制できる免疫を獲得するためには、2～3回の免疫感染が必要であると言われている。

【0005】 現在、コクシジウム症の予防、防疫は薬剤に大きく依存している。1936年まで薬剤は使用されていなかったが、硫黄を飼料に少なくとも 1.5% 添加することにより、アイメリア テネラ感染による死亡を減少させることができた。しかし、ローテーションプログラムで投与を行っているものの、薬剤耐性株、薬剤感受性低下株の出現などにより未だコクシジウム症の撲滅はなされていない。

【0006】 このような現状から、コクシジウム症の基本的な免疫学的研究が行われることとなり、今まで様々な知見が得られることとなった。ヒナがコクシジウム症に感染すると、感染後約1週間で、液性免疫により、血清中に IgG 並びに IgM クラスの特異抗体が産生する。これらの抗体が原虫表面の抗原と結合することで、補体を活性化し、スプロゾイト並びにメロゾイトの溶解を引き起こすことが知られている (Witlock and Danforth, Journal of Protozoology 29 (3) : 3190-3196, 1982)。血清抗体の作用の1つにオプソニン作用が存在するが、非効化血清を感作させたスプロゾイト、メロゾイトを培養腹腔マクロファージに接種すると、非処理血清を感作させた場合と比較して、該マクロファージの食食能が明らかに高いことも確認されている。このような作用をもつ抗体であるが、ヒナ体内における感染防御の程度ははいたって不明瞭である。コクシジウム症では、腸管粘膜組織細胞内で増殖する原虫により発症するため常に血清抗体にさらされているわけではなく、このことが血清抗体の作用を減じている原因となっていると考えられている。ローズらは、免疫ヒナ腸管組織内へのスプロゾイトの侵入刺激により、腸管組織中の血管透過性が上昇し、血清

抗体が腸管に漏出し、原虫の滅殺作用が発揮するように考えている (Rose et al., *Parasite Immunology* 2(3): 189-199 (1980))。

【0007】次に、局所免疫については、コクシジウム症は、経口的なオーシストの感染を経なければ発症しないことから、静脈内接種、筋内接種などで局所免疫を誘導することは困難である。デイビスらは、アイメリアイネラで免疫したヒナ盲腸内容物をスポロゾイト、メロゾイトに感作させたところ、ヒナ腎臓細胞でスポロゾイト、メロゾイトの侵入阻止能が認められた (Davis et al., *Immunology* 36(3): 471-477 (1979))。その後の研究で、この侵入阻止能は、分泌型 IgA (SIgA) によるものであることが証明された。SIgAは盲腸粘膜を通過したものではなく、上皮細胞組織に局在するプラズマ細胞によって産生されたものである。しかし、これらのSIgAは侵入したスポロゾイトに対しては効果を示さず、厳密な中和作用を持たないことが示された。これらより、SIgAは一般に、スポロゾイトの腸管粘膜組織への侵入阻止により、感染防御能を発揮していると考えられている。

【0008】一方、アイメリアイネラと近縁なトキソプラズマでは、細胞性免疫が主体だと考えられているが、アイメリアイネラにおいては、寄生部位が腸管粘膜上皮細胞に限られるため、細胞性免疫の関与はそれほど大きないと考えられてきた。しかしながら、*in vitro*での数々の細胞性免疫に関する報告が近年されており、例えば、インターフェロンによるマクロファージの活性化の報告 (Lillehoj, *Avian Disease* 37(3): 731-740 (1993)) 等により、細胞性免疫では、活性化したマクロファージが、原虫と結合した IgG 抗体のオプソニン作用により貪食能を高め、原虫を溶解又は滅殺するものと推測できる。

【0009】*in vivo*においては、前記免疫機構が複雑にからみあって免疫反応が成立していると考えられる。これらの知見をもとに、生ワクチンが開発され、強毒株、弱毒株等が使用されている。強毒株では、オーシストの数を調整しながら免疫を付与する方法 (Nakai et al., *Avian Disease* 36(4): 1034-1036 (1992)) と、薬剤感受性株をワクチン株として投与し免疫を付与した後に、コクシジウムを薬剤で制御する方法が知られている。弱毒株では、病原性を弱めた鶏卵内継代株とプレパテントピリオドで継代を続けたものが知られている (Shirley and Millard, *Avian Pathology* 15: 629-638 (1986))。しかし、これら生ワクチンは、感染可能なオーシストを野外に撒き散らす危険性、抗原性変異野外株出現の危険性も指摘されている。

#### 【0010】

【発明が解決しようとする課題】前記生ワクチンの問題点を解決するものとして、リコンビナント・ワクチンが注目されている。これは、遺伝子組換え技術により作製された抗原を用いたワクチンであり、そのための感染防御能を有する虫体抗原の検索が行われている。例えば、

クレインら (Crane et al., *Infection and Immunity* 59(4): 1271-1277 (1991)) は、虫体より非常に感染防御能を有する抗原を分離しているが、決定的にコクシジウム症を抑制するという報告はまだない。また、特開昭61-502586号公報では、アイメリアイネラスポロソイドの cDNA 又はゲノムライブリーから得られた DNA とその発現タンパク質 (約 290 アミノ酸残基) について報告されているが、製造されているのは  $\beta$ -ガラクトシダーゼと球形胞子虫抗原の融合タンパク質であり、しかも、これを用いて単に重症度が多少低下したことを示すに過ぎない。

【0011】一方、アイメリアイネラスポロソイドから精製されたタンパク質をワクチンとして使用する試みについても種々の報告がされている。例えば、特開昭61-18724号公報では、アイメリアイネラスポロソイド又はスポロソイド形成オーシストの懸濁液抽出物から SDS-PAGE で 13 種のペプチドが分離され、特開昭61-69798号公報では、アイメリアイネラスポロソイドの精製タンパク質として分子量 25 kDa (ジスルフィド結合で 17 kDa と 8 kDa が結合) のものが、特開平2-264731号公報では、アイメリアイネラスポロソイドからの 5 つの主要糖脂質複合タンパク質の精製 (分子量 32 kDa, 29 kDa, 26 kDa, 25 kDa, 18 kDa) について報告されている。さらに、特開平2-35085号公報では、アイメリアイネラスポロソイドの cDNA 又はゲノムライブリーから得られた DNA を用いての組換えタンパク質免疫原と、アイメリアイネラスポロソイドの精製タンパク質をワクチンとして使用することについて報告されている。しかしながら、これらの報告では、盲腸病変の重篤度をスコアにして評価しているが、いずれの結果もワクチンによる感染防御は難しく、その病変に対する効果は不充分であると考えられる。従って、感染防御能を有する抗原の検索が今後の研究課題といえる。

【0012】そこで、本発明の第 1 の目的は、コクシジウム症ワクチンとして有用な、アイメリアイネラのオーシストより精製される抗原を提供することにある。本発明の第 2 の目的は、該抗原を含むワクチンを提供することにある。さらに、本発明の第 3 の目的は、該ワクチンを使用して、コクシジウム症に対して免疫応答を誘導する方法を提供することにある。

#### 【0013】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、アイメリアイネラスポロゾイトの表面抗原を認識するモノクローナル抗体 (KC-1 抗体) が、アイメリアイネラの細胞侵入ステージであるスポロゾイトの細胞侵入を *in vitro* で有意に阻害すること、また、宿主細胞抽出物と該スポロゾイトを反応させると、KC-1 抗体とスポロゾイトの反応が消失することから、KC-1 抗体が認識する抗原 (KC-1 抗原) が宿主細胞接着分子であることが示唆される点に

着目し、鋭意研究を重ねた結果、アイメリア テネラのオーシスト由来の抽出物を、モノクローナルKC-1抗体結合アフィニティークロマトグラフィーにより精製することにより、ワクチンとして有用な抗原を精製することに成功した。本発明はかかる事実に基づいて完成するに至ったものである。

【0014】即ち、本発明の要旨は、(1) アメリア テネラのオーシストから抽出され得る、SDS-PAGE (還元下) での分子量が 25 kDa で、等電点が 3.68 である、鶏のコクシジウム症に対する免疫応答の誘導能を有する糖ペプチドからなる抗原、(2) スポロゾイトの表面抗原を認識するモノクローナル抗体の結合したアフィニティークロマトグラフィーにより精製される、前記(1)記載の抗原、(3) 該モノクローナル抗体が、FERM P-15954 のハイブリドーマにより産生されるモノクローナルKC-1抗体である前記(2)記載の抗原、(4) 前記(1)～(3)いずれかに記載の抗原を含むワクチン、(5) 前記(4)記載のワクチンの免疫学的有効量を鶏に投与することを特徴とする、鶏のコクシジウム症に対して免疫応答を誘導する方法、に関する。

#### 【0015】

【発明の実施の形態】本発明のアイメリア テネラのオーシストから抽出される精製抗原 (KC-1抗原) の物理化学的特徴は、以下の通りである。

1. 分子量 : 25 kDa (SDS-PAGE (還元下) での分子量、還元条件下での SDS-PAGE によってもサブユニットに分かれることはない)。

2. 等電点 : 3.68。

3. 糖タンパク質 : 過ヨウ素酸法により、糖を含むことが示される。

4. アメリアの各ステージでの存在 : アメリア テネラのスポロゾイトには存在するが、胞子未形成オーシスト、第2代メロゾイト、マクロガメートおよびミクロガメートには存在しない。

【0016】本発明のアイメリア テネラのオーシスト由来の抗原は、以下のように精製される。

##### i) オーシスト由来のタンパク質の精製。

本発明者らにより継代された家畜衛生試験場由来アイメリア テネラNIAH株を、7日齢のブロイラー又は10日齢のレイヤーに該胞子形成オーシスト 1.0×10<sup>4</sup> 個を経口接種し、接種後6～8日目の糞便を回収する。回収した糞便中のオーシストを夾雑物を除去した後に、胞子を形成させ、胞子形成後のオーシストから飽和食塩浮遊法により微細な夾雑物を除去し、2.5% 重クロム酸カリウム溶液に浮遊させて 4°C で保存したものを使用する。

【0017】前記オーシストを蒸留水で3回遠心洗浄を行うことにより、重クロム酸カリウムを除去する。遠心分離後のオーシストの容量の約5倍量の漂白剤を添加して 0°C、10 分間処理し、蒸留水で3回遠心洗浄を行

い、精製オーシストとする。PMSF 1 mM およびアプロチニン 200 Kallikrein units/ml を含む 0.1 M トリス緩衝液 (pH 6.8) で3回遠心洗浄し、同緩衝液に再浮遊する。オーシスト浮遊液の 1/3 量のガラスピーズを加え、氷冷下で10回超音波処理を行い、前述の緩衝液に 10 mM EDTA と 3% NP-40 を加えた抽出用緩衝液をオーシスト破碎液に等量加え、4°C で一夜静置する。抽出液を遠心分離し、上清のタンパク濃度を決定した後、使用まで -80°C で保存する。

##### 【0018】ii) KC-1 抗原の精製。

A. 陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製  
陰イオン交換担体として DE-52 (Whatman 社製) を使用し、前記記載のオーシスト由来のタンパク質を倍量のトリス緩衝液に懸濁し、カラムにアプライし、吸着を行う。吸着後、約 3 倍量のトリス緩衝液で洗浄を行い、タンパク質が完全に溶出されるまで洗浄を行う。1M NaCl を使用して溶出を行う。抗原活性測定は ELISA 法を用い、活性が確認された画分は、No. 1～5 の 5 つに分取し、脱塩後凍結乾燥を行う。

##### 【0019】B. アフィニティークロマトグラフィーによる精製

###### (1) KC-1抗体の調製

本発明のモノクローナル抗体である KC-1 抗体を調製するには以下のようを行う。前記精製オーシストをテフロンホモジナイザーで氷冷下 40 分間処理し、オーシスト壁を破壊、洗浄後、10% (v/v) ニワトリ胆汁添加の 0.3% (w/v) トリプシン-0.1M リン酸緩衝液 (pH 8.0) 中で、41°C 60 分間処理し、0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を用いて遠心洗浄し、遊離したスポロゾイトを Schmats らの方法 (J. Protozool., 31: 181-183 (1984)) により、精製する。2.5×10<sup>5</sup> 個の精製スポロゾイトを PBS に浮遊させ、BALB/Cマウスに 2 週間隔で 3 回、尾静脈あるいは腹腔内に接種する。その 1 週後に同量のスポロゾイトを尾静脈注射して最終免疫を行う。最終免疫 3 日後のマウスから脾臓を摘出し、RPMI1640 培地を用いて脾細胞浮遊液を調製する。ミエローマ細胞には P3X63-Ag8.653 株 (ATCC CRL 1580) を用いる。前記脾細胞とミエローマ細胞を 10:1 の割合で混合し、50% w/v ポリエチレンギリコール 4000 (Roth 社製) を含む RPMI1640 培地を加え、細胞融合を行う。融合細胞を HAT 培地を用いて選択し、ハイブリドーマを得る。アイメリア テネラのオーシスト抗原に対する抗体を産生するハイブリドーマを ELISA 法にてスクリーニングし、さらに IFA 法によってスポロゾイトに反応するハイブリドーマを確立する。該ハイブリドーマは、Mouse-Mouse hybridoma KC-1 と表示され、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 [宛名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305)] に FERM P-15954 (寄託日: 平成 8 年 11 月 20 日) として寄託されている。ハイブリドーマ (FERM

M P-15954) を予めプリスタンを投与したBALB/cマウスの腹腔内に接種し、10~14日後に高濃度のモノクローナルKC-1抗体を含む腹水を回収する。回収された腹水を、イムノプロットやELISA法ではアフィゲルプロテインA (Bio-rad 社製) で、それ以外は以下の方法で抗体精製を行う。まず、脱塩カラム (Bio-rad 社製) を用いて、腹水をアフィゲルヒドラジンカップリングバッファー (pH5.5) (Bio-rad 社製) にバッファー交換する。次に、バッファー交換を行った腹水をDEAEアフィゲルブルー (Bio-rad 社製) に280 nmの吸光度でモニターしつつ、流速1.0ml/minで通過させ、そしてボイドボリュームに溶出したものを精製KC-1抗体として回収し、使用する。

#### (2) KC-1抗体の前処理

前記精製KC-1抗体に、過ヨウ素酸ナトリウムを、Ig G抗体:過ヨウ素酸ナトリウム=10:1(体積比)になるように加え、遮光して室温で1時間転倒混和することにより、抗体の酸化を行う。10倍希釈したアフィゲルヒドラジンカップリングバッファー (pH5.5) (Bio-rad 社製) で平衡化したおいた脱塩カラム (Bio-Rad 社製) を用いて、速やかにKC-1抗体の脱塩を行い、回収したIg G抗体をプロテインアッセイキットを用いて濃度を決定する。

#### (3) 抗体カップリング

アフィゲルヒドラジンカップリングバッファー (pH5.5) で3回以上洗浄したアフィゲルヒドラジンゲル (Bio-Rad 社製) を、該カップリングバッファーに懸濁する。酸化、脱塩を行った前記(2)記載の前処理されたKC-1抗体を1.0mg/mlゲルになるように該ゲルに加え、室温で24時間転倒混和することにより、カップリング反応を行う。反応後、エコノカラム (Bio-Rad 社製) にゲルを移し、ゲルの体積と等量のPBS + 0.5M NaClでカラムを洗浄し、溶出液を回収してカップリング効率を計算する。カラムを10倍量のPBS + 0.5M NaCl (0.02% NaN<sub>3</sub>添加) で洗浄して、アフィニティーカラムとして使用する。

#### (4) 試料の吸着

使用前に、前記アフィニティーカラムの至適化を行う。4°Cのカラムを室温に戻し、抗原溶出に選択したバッファーを、カラムの体積の2倍量加え、さらに、10倍量のサンプルアプライバッファー (PBS) でカラムを洗浄する。前記Aで活性の高い3画分 (No.1~3) に2倍量のPBSを加えて試料とした。該試料をカラムに吸着させた後、5~10倍量のPBSでカラムを洗浄し、非特異結合を除くため、2倍量のPBS + 0.5M NaClでカラムの洗浄を行う。さらに5倍量のPBSでカラムを洗浄後、抗原溶出バッファーをアプライする。

#### (5) 抗原溶出

抗原溶出バッファーとして、5M Gu-HCl (pH2.5) を使用し、溶出画分を2倍量のリン酸緩衝液 (pH8.0) で中和す

る。カラムの再生は、2倍量のリン酸緩衝液 (pH8.0) で中和し、10倍量のPBS (0.02% NaN<sub>3</sub>添加) で洗浄することにより行う。

#### (6) 活性測定

KC-1抗体を用いるELISA法により、前記各画分の抗原活性を測定する。活性が確認された画分は、脱塩後、凍結乾燥を行い、本発明の精製抗原とする。該精製抗原は、使用するまで-80°Cで保存する。

【0020】C. SDS-PAGE、ウエスタンプロッティング及び等電点電気泳動による抗原の同定前記精製抗原のSDS-PAGE(還元下)、ウエスタンプロッティングを常法により行い、本発明の精製抗原がKC-1抗体により認識されることを確認し、分子量を同定する。63kDa、25kDa及び12kDaにバンドが検出され、これらのうち、25kDaのタンパク質のみが抗原性を有する。また、等電点電気泳動により、該25kDaのタンパク質のpIは、3.68である。

【0021】アイメリアは宿主に対してのみならず、異宿主への侵入においても非常に厳密な部位特異性をもっている (Augustine, Avian Disease 34(1):196-202(1990))。このことは、宿主細胞とスポロゾイトとの間に非常に特異的な認識機構が存在し、その作用が宿主への侵入を仲介していると考えられる。近年、侵入直後に、宿主細胞表面に虫体由来のポリペプチドが存在することが電子顕微鏡で確認された。これは、スポロゾイト表面分子と宿主細胞表面分子の結合作用後、侵入を開始し、侵入中にスポロゾイト表面分子である接着分子が脱落したためと推測されている。これまで、それらの表面分子を明らかにするために、様々な物質によるスポロゾイトのin vitro侵入阻害試験が行われている。その結果、宿主細胞を酵素や陽イオン物質 (Augustine, Journal of Parasitology 66(3):498-505(1980)、Augustine and Danforth, Journal of Immunology 14(9):3190-3196(1984)) あるいはレクチン (Augustine, Poultry Science 64(12):2296-2299(1985)) で処理することによって、侵入が阻害されることが明らかとなっている。

【0022】本発明者らにより作製されたモノクローナル抗体KC-1は、アイメリアテネラスピロゾイトの侵入を60%以上有意に阻害することが確認されており、細胞侵入に関与するスポロゾイト分子を認識していると考えられる。また、アイメリア科に属するCryptosporidium parvumでは、in vivoで発育を支配するスポロゾイト表面糖タンパクが同定されており (Tilley et al., Infection and Immunity 59(3):1002-1007(1991))、Trypanosoma cruziやPlasmodium falciparumでは、シアル酸を介して宿主細胞認識が行われることが知られている (Schenkman, Cell 65(7):1117-1126(1991)、Perkins, Journal of Immunology 141(9):3190-3196(1988))。

【0023】本発明のワクチンは、前記精製抗原を有効量含むものであり、免疫効果を高めるために、例えば、

以下のアジュバント等を含んでも構わない。ワクチン接種に適当なアジュバントとしては、フロイント (Freund's) の完全または不完全アジュバント；水酸化アルミニウム、アルミナ水和物、塩化カルシウム2水和物、みょうばん等の無機物ゲル；サポニン、アルギン酸ゲル、フォスファチジルコリン、レシチン等の界面活性剤； $\beta$ -グルカン、キトサン等の多糖類；ポリオキシプロピレン・ポリオキシエチレン、アクリル酸・メタクリル酸コポリマー等の合成高分子；ムラミルジペプチド、リポボリサッカライド、サイトカイン類等の天然免疫賦活物質；レバミゾール、タフトシン等の合成免疫賦活物質等が挙げられるが、これらには限定されない。アジュバントは通常、抗原と共に投与されるが、抗原投与の前または後に与えてもよい。抗原はまた、リポソーム、オリゴマンノース被覆リポソーム又は他のマイクロキャリアーに取り込ませて投与することができる。さらに、他のアイメリア種由来の抗原を混合して用いることも可能であり、それによって、複数のコクシジウム感染症に対する防御免疫を誘導することもできる。

【0024】本発明のワクチンを投与する方法としては、通常の経口、経皮投与方法が可能であり、好ましくは注射により腹腔内、筋肉内又は皮下に投与することができ、あるいは点鼻、点眼等より投与することも可能である。さらに、飲水、噴霧、散霧により、経口又は呼吸により体内に投与することも可能である。ワクチンの投与量は、通常、抗原量として0.001～5mg/kg体重であるが、必要とする予防の程度に応じて、投与量を増加させたり、投与回数を増大させればよい。

【0025】本発明のワクチンは、アイメリア テネラ等のコクシジウム感染症の起因原虫感染の予防に対して有用である。即ち、本発明のワクチンの免疫学的有効量を鶏に投与することにより、鶏のコクシジウム症に対して免疫応答を誘導することができる。本発明のワクチンの効果を評価するには、本発明のワクチンを接種後、予め病変指數が重度感染である+3になるようにオーシスト数を調整して攻撃感染させ、その7日後に、増体量、盲腸長及び病変指數を評価する。該評価方法は、後述の実施例4に記載されている。

#### 【0026】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

#### 【0027】材料

##### (1) 供試原虫

本発明者らにより継代された家畜衛生試験場由来アイメリア テネラNIAH株を、すべての実験において使用した。継代は、7日齢のブロイラーあるいは、10日齢のレイヤーにアイメリア テネラ胞子形成オーシスト1.0 $\times$ 10<sup>4</sup>個を経口接種し、6～8日目の糞便を回収した。回収した糞便中のオーシストは、夾雑物を除去した後に2

7～29°Cで3日間培養することにより、胞子を形成させた。胞子形成後のオーシストは飽和食塩浮遊法により微細な夾雑物を除去し、2.5%重クロム酸カリウム溶液に浮遊させ4°Cで保存した。オーシスト数はビュルケルチュルク血球計算盤で計数した。

#### 【0028】(2) 供試抗体

本発明者らにより、アイメリア テネラの精製スプロゾイトを免疫抗原として作製されたマウスモノクローナルKC-1抗体（後述の実施例2を参照）を使用した。抗体のアイソタイプはIgG3kであり、アイメリア テネラを感染させたニワトリ盲腸切片内の初代未成熟シゾント、初代メロゾイト、初代成熟シゾントおよび糞便放出後の胞子形成オーシストの内部と交差反応を示し（表1）、アイメリアアセルブリナ、アイメリア ブルネットィ、アイメリア マキシマ、アイメリア ミティス、アイメリア ネカトリックス、アイメリア プレコックスの塗沫風乾スプロゾイトとは交差反応を示さないことが確認されている（表2）。また、PCK細胞に対するアイメリア

テネラスプロゾイトの侵入を阻害することが確認されており、この抗体は、アイメリア テネラの細胞侵入に関与するスプロゾイト分子を認識していると考えられる。KC-1抗体は腹水の状態であったため、イムノプロット、ELISA法ではアフィゲルプロテインA（Bio-rad社製）で、それ以外は以下の方法で抗体精製を行った。まず、脱塩カラム（Bio-rad社製）を用いて、腹水をアフィゲルヒドラジンカップリングバッファー（pH5.5）（Bio-rad社製）にバッファー交換した。次に、バッファー交換を行った腹水をDEAEアフィゲルブルー（Bio-rad社製）に280nmの吸光度でモニターしつつ、流速1.0ml/minで通過させ、ボイドボリュームに溶出したものを精製抗体として回収し、使用した。

#### 【0029】

##### 【表1】

ステージ	KC-1抗体の反応性
スポロゾイト	++
トロフォゾイト	++
初代未成熟シゾント	+
初代成熟シゾント	+
初代メロゾイト	+
2代未成熟シゾント	-
2代成熟シゾント	-
2代メロゾイト	-
マクロガメート	-
ミクロガメート	-
未成熟オーシスト	-

++ : 強陽性  
+ : 弱陽性  
- : 陰性

## 【0030】

【表2】

アイメリア種	KC-1抗体の反応性
アイメリア テネラ	+
アイメリア アセルブリナ	-
アイメリア ミティス	-
アイメリア マキシマ	-
アイメリア ブルネットイ	-
アイメリア ネカトリックス	-
アイメリア ブレコックス	-

## 【0031】実施例1. オーシスト抗原の調製

前記(1)記載の保存オーシストを、蒸留水で3回遠心洗浄(3000rpm、10min)を行うことにより重クロム酸カリウムを除去した。沈渣の約5倍量の漂白剤(ピューラックス、オーヤラックス社)を加え消毒(氷冷下、10分)して、精製オーシストとし、蒸留水で3回遠心洗浄(3000rpm、10min)を行った。PMSF 1mMおよびアプロチニン200Kallikrein units/mlを含む0.1Mトリス緩衝液(pH6.8)で3回遠心洗浄し、同緩衝液0.5mlに再浮遊した(3X10<sup>7</sup> オーシスト/0.5ml)。オーシスト浮遊液の1/3量のガラスビーズ(0.3mm)を加え、氷冷下で10回超音波装置(25W、30秒: Ohtake works, Tokyo)を用いて処理を行うことにより、オーシストを破碎した。10mM EDTAと3% NP-40を含む前記緩衝液を抽出用緩衝液として、オーシスト破碎液に等量加え、4℃で一昼夜静置した。抽出液を遠心分離(15000rpm、10分)し、上清のタンパク濃度をBio-Rad プロテインアッセイキット(Bio-Rad社製、Richmond, CA)により決定した後、使用まで-80℃で保存した。

## 【0032】実施例2. KC-1抗原の分離精製

A. 陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製

陰イオン交換担体としてDE-52(Whatman社製)を使用し、カラムサイズは、3X11cmであった。バッファーは、20mMトリス緩衝液(pH8.0)を使用し、グラジエントミキサー(Pharmacia社製)を用い、最終濃度1M NaClで溶出を行った。まず、実施例1で得られたオーシスト抗原を2倍量のトリス緩衝液に懸濁し、カラムにアプライし、吸着を行った。吸着後、カラム体積の約3倍量のトリス緩衝液で洗浄を行い、タンパク質が完全に溶出されるまで洗浄を行った。カラム体積の2倍量の1M NaClを使用し、溶出を開始した。抗原活性測定はELISA法により行った。活性が確認された画分は、No. 1~5の5つに分取し、脱塩後凍結乾燥を行った。特に活性が高かった画分(No. 3)はSDS-PAGE、ウエスタンブロッティングを実施例2. B(9)に記載の方法で行い、ポリペプチドの確認を行った。

## 【0033】B. アフィニティーコロマトグラフィーによる精製

## (1) モノクローナルKC-1抗体の調製

前記精製オーシストをテフロンホモジナイザーで氷冷下40分間処理し、オーシスト壁を破壊、洗浄後、10% (v/v) ニワトリ胆汁添加の0.3% (w/v) トリ

ブシンーO. 1M リン酸緩衝液 (pH 8.0) 中で、4 1°C 60 分間処理した。O. 1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を用いて遠心洗浄し、遊離したスポロゾイトを Schmats らの方法 (J. Protozool., 31:181-183 (1984)) により、精製した。2.5×10<sup>5</sup> 個の精製スポロゾイトを PBS に浮遊させ、BALB/Cマウスに 2 週間隔で 3 回、尾静脈あるいは腹腔内に接種した。その 1 週後に同量のスポロゾイトを尾静脈注射して最終免疫を行った。最終免疫 3 日後のマウスから脾臓を摘出し、RPMI1640 培地を用いて脾細胞浮遊液を調製した。ミエローマ細胞には P3X63-Ag8.653 株 (ATCC CRL 1580) を用いた。前記脾細胞とミエローマ細胞を 10:1 の割合で混合し、50% w/v ポリエチレンギリコール 4000 (Roth 社製) を含む RPMI 1640 培地を加え、細胞融合を行った。融合細胞を HAT 培地を用いて選択し、ハイブリドーマを得た。アイメリニア

テネラのオーシスト抗原に対する抗体を産生するハイブリドーマを ELISA 法にてスクリーニングし、さらに IF A 法によってスポロゾイトに反応するハイブリドーマ KC-1 (FERM P-15954) を確立した。1×10<sup>6</sup> 個の該ハイブリドーマを予めブリスタンを投与した BALB/Cマウスの腹腔内に接種し、10~14 日後に高濃度のモノクローナル KC-1 抗体を含む腹水を回収した。回収された腹水を前記の方法により精製し、精製 KC-1 抗体を得た。

#### (2) KC-1 抗体の前処理

精製抗体の酸化、バッファー交換を行った。すなわち、10 倍希釈したアフィゲルヒドラジンカップリングバッファー (pH 5.5) (Bio-rad 社製) で平衡化した脱塩カラム (Bio-Rad 社製) で抗体のバッファー交換を行った。過ヨウ素酸ナトリウム (NaIO<sub>4</sub>) を蒸留水で 20.8 mg/ml になるように溶解した。IgG : NaIO<sub>4</sub> = 10 : 1 (体積比) になるように NaIO<sub>4</sub> を加え、遮光して室温で 1 時間転倒混和した。速やかに、IgG の脱塩をカップリングバッファーで行い、回収した IgG をプロテインアッセイキットを用いて濃度を測定した。

#### (3) 抗体カップリング

カップリングバッファーで 3 回以上洗浄したアフィゲルヒドラジンゲル (Bio-Rad 社製) 3 ml をカップリングバッファー 5 ml に懸濁した。酸化、脱塩を行った精製抗体を 1.0 mg/ml ゲルになるように加え、室温で 24 時間転倒混和した。反応後、エコノカラムにゲルを移し、1 倍量 PBS + 0.5 M NaCl でカラムを洗浄した。溶出液を回収し、カップリング効率を計算した。カラムを 10 倍量の PBS + 0.5 M NaCl (0.02% NaN<sub>3</sub> 添加) で洗浄し、使用まで 4°C で保存した。

#### (4) カラムの至適化

使用前に、前記アフィニティーカラムの至適化を行った。4°C のカラムを室温に戻し、抗原溶出に選択したバッファーを、カラム体積の 2 倍量加えた。さらに、10 倍量のサンプルアプライバッファー (PBS) でカラムを洗浄

した。

#### (5) 試料の吸着

前記 A で活性の高い 3 画分 (No. 1~3, 3 mg) に 2 倍量の PBS を加えて試料とした。試料の吸着は、室温 5 時間又は 4°C 一晩で行った。5~10 倍量の PBS でカラムを洗浄し、非特異結合を除くため、2 倍量の PBS + 0.5 M NaCl でカラムの洗浄を行った。さらに 5 倍量の PBS でカラムを洗浄後、後述の抗原溶出バッファーをアプライした。

#### (6) 抗原溶出

抗原溶出バッファーとして、5 M Gu-HCl (pH 2.5) を使用し、溶出画分を 2 倍量のリン酸緩衝液 (pH 8.0) で中和した。カラムの再生は、2 倍量のリン酸緩衝液 (pH 8.0) で中和し、10 倍量の PBS (0.02% NaN<sub>3</sub> 添加) で洗浄することにより行った。

#### (7) 活性測定

ELISA 法を用いて活性を測定し、活性が確認された画分については、脱塩後、凍結乾燥を行い、使用するまで -80°C で保存した。図 1 にアフィニティークロマトグラフィーの結果を示す。

#### (8) SDS-PAGE

活性画分の SDS-PAGE、ウエスタンプロットを行った。SDS-PAGE は電気泳動装置 (Cima 社製) を用いて、Laemmli の方法 (Laemmli, U.K. Nature 227:680-685 (1970)) に従って行った。12.5% ポリアクリルアミドゲルを用いて CBB 染色、またはウエスタンプロットに供した (図 2)。

#### (9) ウエスタンプロット

ウエスタンプロットはセミドライ式転写装置 (Bio-Rad 社製) を用いて、Towbin ら (Towbin, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:4350-4354 (1979)) の方法に従って行った。膜転写した抗原の検出は、ABC (アビジン-ビオチン複合体) 試薬 (Vector 社製) を用いる酵素抗体 ABC 法により行った。

#### 【0034】実施例 3. 精製抗原 (KC-1 抗原) の分析

還元条件下での SDS-PAGE で分子量 63 kDa, 25 kDa, 12 kDa のバンドが検出された (図 2)。ウエスタンプロット後に KC-1 抗体と反応したものはこれら 3 バンドのうち 25 kDa のみであった (図 2)。還元条件下での SDS-PAGE によって 25 kDa 以下の抗体陽性バンドは検出されないことがから、25 kDa のタンパク質はサブユニット構造をとらないものと考えられた。オーシストをプロテアーゼ阻害剤を含んだトリス緩衝液に浮遊し超音波破碎した。これに NP-40 を含むトリス緩衝液を等量加え、4°C 一晩静置後、遠心上清に含まれる可溶性オーシスト抗原をファストシステム (ファルマシア社) によって分析した。等電点電気泳動を行った後、ウエスタンプロットし、モノクローナル抗体 KC-1 を用いて免疫染色し、抗体に反応するバンドの検出を行った。この結果、該 25 kDa の

タンパク質の等電点は3.68であることが示された。上記の可溶性オーシスト抗原について上記同様にSDS-PAGEを行い、PVDF膜にウエスタンプロットした。プロットしたPVDF膜を0.5%過ヨウ素酸ナトリウムで4°C 2時間処理した後にモノクローナル抗体KC-1を用いて免疫染色しころ、陽性反応は見られなくなつた。このことはモノクローナル抗体KC-1が認識するエピトープに糖が関与することを示しており、KC-1抗原が糖を含むことを意味している。また、精製抗原を用いても同様の成績が得られた。

【0035】アイメリア テネラを鶏に経口感染し、盲腸を定期的に採材して各発育段階にある原虫を含む組織切片を作製した。これらに対して、モノクローナル抗体KC-1を用いて免疫染色しころ、胞子形成過程のオーシスト、スポロゾイト、初代シゾント、および初代メロゾイトは陽性反応を示したが、胞子未形成オーシスト、第2代シゾント、第2代メロゾイト、マクロガメートおよびミクロガメートは陰性であった。これらのこととは、KC-1抗原は胞子形成過程のオーシスト、スポロゾイト、初代シゾントおよび初代メロゾイトに含まれていが、他の発育段階には含まれないことを意味している。アイメリア アセルブリナ、アイメリア ブルネットィ、アイメリア マキシマ、アイメリア ミティス、アイメリア ネカトリックス、アイメリア ブレコックスのオーシストから人工脱殻法によってスポロゾイトを調製し、スライドグラスに塗抹風乾して、モノクローナル抗体KC-1を用いて免疫染色しころ、これらに対しては陽性反応は認められず、アイメリア テネラスポロゾイトだけがKC-1抗体と反応した。

【0036】実施例4. KC-1抗原を含むワクチンの利用コンポーネント(成分)ワクチンとしてKC-1抗原を用い、in vivoによる感染実験を行った。KC-1免疫鶏と通常鶏に攻撃感染を行い、血中抗体誘導の相違を観察した。また、免疫回数を増加し、実際に攻撃感染に対する病変程度を評価した。供試動物として、ブロイラーを、供試原虫としてアイメリア テネラNIAH株を供試した。

【0037】A. コクシジウム感染による抗体価の測定  
(1) 実験系

2日齢時にブロイラーの体重測定を行い、1群2羽になるように群分けした。1群を非免疫の対照群とし、2群を免疫群とした。免疫は2日齢、9日齢に行い、両群ともに16日齢に弱い攻撃感染( $3.0 \times 10^2$ 個/羽)を行つた。

(2) 抗原精製

実施例2に記載の方法により行った。

(3) 免疫抗原の準備

初回免疫はフロイント完全アジュバントを用いた。タンパク量は、1羽あたり $10 \mu\text{g}$ になるようにPBSに溶解した。アジュバント:タンパク質=10:8になるように混合し、注射筒で緩やかにエマルジョンが形成されるま

で搅拌した。追加免疫は、フロイント不完全アジュバントを用いた点を除いては、初回免疫と同様に行った。

(4) 採血

2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26日齢鶏の翼下静脈より採血を行つた。

(5) 抗体価測定

ELISAは高結合タイプ96ウェル平底EIAプレート(Costa r社製, Cambridge, MA)を用いてVollerらの方法(Voller, A. et al., Bull. World Health Organ. 53:55-65(1976))に基づいて行った。プレートの各ウェルに、50mM炭酸緩衝液(pH9.6)で $5 \mu\text{g/ml}$ に希釈した抗原を $100 \mu\text{l}$ ずつ分注し、4°Cで一晩コーティングした。抗原を除いたのち、1%BSA添加PBS(-)を $200 \mu\text{l}$ 加え、室温で2時間ブロッキングした。ブロッキング液の除去後、0.1%BSA添加PBSTで200倍希釈した抗血清を $100 \mu\text{l}$ ずつ加え、室温で1時間反応させた。抗血清除去後、PBSTで5回洗浄し、0.1%BSA添加PBSTで $1 \mu\text{g/ml}$ に希釈したペルオキシダーゼ(HRP)標識ウサギ抗ニワトリIgG抗体(H+L鎖特異的; Cappel社製, West chester, PA)を $100 \mu\text{l}$ ずつ加え、室温で1時間反応させた。PBSTで5回洗浄後、基質溶液を $100 \mu\text{l}$ ずつ加え、遮光して室温で30分反応させ、マイクロプレートリーダーで405nmの吸光度を測定した。

【0038】図3に抗体価の推移の結果を示した。抗原接種前の2日齢に、非免疫群(1群)、免疫群(2群)ともに高い抗体価を示した。その後非免疫群では、5日齢で抗体価が上昇するものの、23日齢まで抗体価が減少し続けた。攻撃感染10日後である26日齢で、抗体価が上昇している。免疫群では、9日齢まで非免疫群と同じ反応が観察されたが、2回目の免疫後、非免疫群より若干高い抗体価レベルを維持した。攻撃感染10日後には、非常に高いレベルでの抗体価の上昇が観察された。

【0039】B. KC-1抗原を含むワクチンのin vivoでの投与

(1) 実験系

2日齢時にブロイラーの体重測定を行い、1群3羽に群分けした。1群を対照群(攻撃感染なし)、2群を非免疫群、3群をオーシスト抽出抗原免疫群、4群を精製抗原(KC-1抗原)免疫群とした。免疫を2日、9日、16日齢に行い、2~4群は23日齢に攻撃感染( $2 \times 10^3$ 個/羽)を行つた。オーシスト数は、予め病変指数が重度感染である+3になるようにした( $2.0 \times 10^3$ 個/羽)。攻撃感染7日後(30日齢)に採材し、病変指数、盲腸長、増体量(23日~30日齢)を評価した。

(2) 抗原精製

3群に用いるオーシスト抽出抗原は実施例1と同様に調製した。4群の精製抗原であるKC-1抗原は、実施例2と同様に調製した。

(3) 免疫抗原の準備

免疫抗原のタンパク量は3群、4群ともに1羽あたり10  $\mu\text{g}$  とし、前記A.と同様に行った。

(4) 採血

抗体価測定のため、2、5、8、11、14、17、20、23日に翼下静脈より採血を行った。

(5) 抗体価測定

前記A.と同様に行つた(図4)。

(6) 盲腸長及び増体量の評価

指 数	病変程度	萎縮の程度	肥厚の程度	腫脹の程度
0 (-)	正常	正 常	なし	なし
1 (+)	軽度	やや萎縮	軽度	軽度
2 (++)	軽～中度	萎縮軽度	軽度	中度
3 (+++)	中～重度	萎縮中度	中度(先端部)	中～重度
4 (++++)	重度	萎縮重度	重度(全体)	重度

【0041】図4に抗体価の推移の結果を示した。非免疫かつ非攻撃感染群(対照群:1群)では、5日齢で抗体価が上昇するものの、14日齢まで抗体価は減少しつづけ、その後26日齢まで、ほぼ同じレベルを維持した。非免疫かつ攻撃感染群(2群)では、5日齢に抗体価が若干上昇し、その後減少し続け23日齢には1群とほぼ同じ抗体価となった。攻撃感染後3日(26日齢)では、抗体価に変化はなかった。オーシスト抽出抗原免疫かつ攻撃感染群(3群)では、5日齢から抗体価が若干低下するものの、他群と比較して23日齢まで高いレベルを維持し続けた。攻撃感染3日後にすでに高い抗体価の上昇が観察された。KC-1抗原免疫かつ攻撃感染群(4群)では2日齢の免疫後、抗体価は徐々に低下したが、2回目の免疫後抗体価の上昇が起り、その後高いレベルの抗体価を維持した。23日齢の攻撃感染後、3日で非常に高い抗体価の上昇が観察された。

【0042】病変指數の結果を表4に示した。対照群である1群は病変指數0であり、盲腸の萎縮や盲腸壁の肥

盲腸長は湿潤紙の上に伸展し、測定した(図5)。病変指數は、Johnson & Reid (EXP. PARASITOL., 28, 30-36 (1970)) の方法を若干変更して判定を行つた(表3)。盲腸長、増体量(図6)及び病変指數は、判定後、t検定を行つた。

【0040】

【表3】

大も観察できず、盲腸は正常だった。攻撃感染を行つた2群では、血液や盲腸コアを盲腸内に含み、末端の盲腸の変形が明瞭で、萎縮が非常に激しかった。また全体的に正常部がほとんど無く、病変指數は3だった。オーシスト抽出抗原免疫を行つた3群では、盲腸の内容物に僅かな血液を含み、外形の変形はほとんど無く、僅かな点状の白変、点状出血斑が観察された。病変指數は2だった。KC-1抗原免疫を行つた4群では、盲腸の萎縮が2群と比較してかなり軽減しており、病変の軽減が観察された。また、出血斑も3群と比較して軽減しており、盲腸内容物にコアは観察されなかった。また、盲腸末端の変形も観察されなかった。病変指數は1.0～2.0だった。精製抗原で免疫した4群と免疫を行わなかった2群との間に有意差( $p < 0.05$ )があり、免疫群は病変を軽減させることを示した。

【0043】

【表4】

群	免疫	攻撃感染	病変指數(平均値 $\pm$ SD)
1	なし	なし	0 $\pm$ 0
2	なし	$2 \times 10^3$	3.0 $\pm$ 0
3	粗抗原	$2 \times 10^3$	2.0 $\pm$ 0
4	精製抗原	$2 \times 10^3$	1.7 $\pm$ 0.6

【0044】盲腸長の結果を図5に示した。攻撃感染を行つた2群の萎縮が最も激しかった。3群、4群間で有意差はなかったものの、KC-1抗原免疫群(4群)の方が成績が良かった。また、2群と4群間で有意差( $p < 0.05$ )があり、KC-1抗原による免疫効果が認められた。

【0045】増体量の結果を図6に示した。群間に統計的有意差は認められなかったが、オーシスト抽出抗原免疫群(3群)は、攻撃感染群(2群)とほとんど同様の

低い増体量を示したにもかかわらず、精製抗原免疫群(4群)は非感染群(1群)とほぼ同値の高い増体量を示した。このことから、精製抗原の免疫は鶏に対するコクシジウム感染の影響を低く抑えられるものと考えられる。

【0046】

【発明の効果】本発明により、コクシジウム症ワクチンとして有用な、アイメリア テネラのオーシストより精製される抗原、該抗原を含むワクチンが提供される。ま

た、該ワクチンを使用して、コクシジウム症に対して免疫応答を誘導する方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、アフィニティクロマトグラフィーによるKC-1抗原の精製の結果を示すグラフである。

【図2】図2は、実施例2BのSDS-PAGEおよびウエスタンプロットティングの結果を示す電気泳動の写真

である。

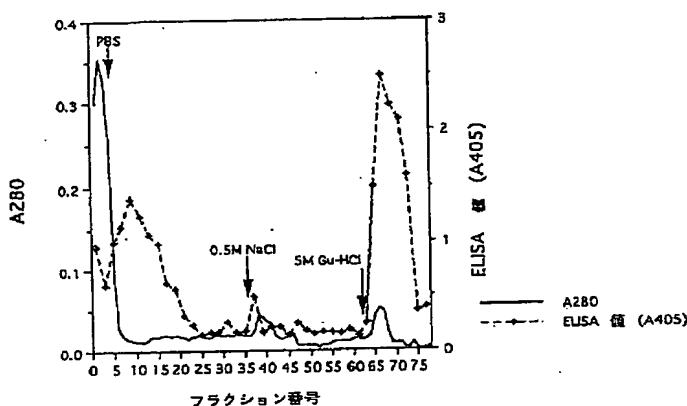
【図3】図3は、実施例4Aにおける免疫後の抗体価の推移を示すグラフである。

【図4】図4は、実施例4Bにおける免疫後の抗体価の推移を示すグラフである。

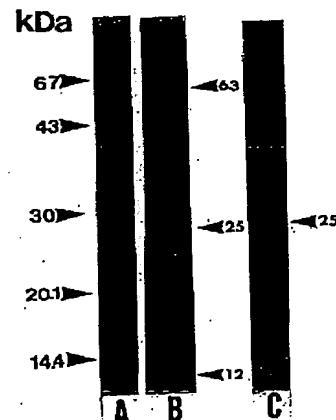
【図5】図5は、盲腸長の相違を示すグラフである。

【図6】図6は、増体量の相違を示すグラフである。

【図1】

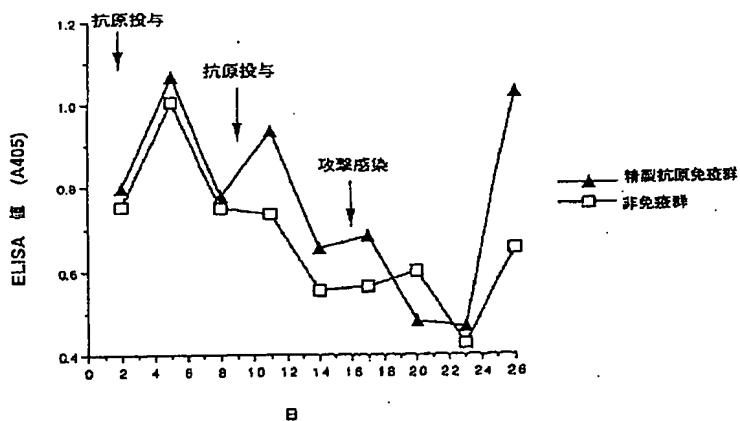


【図2】



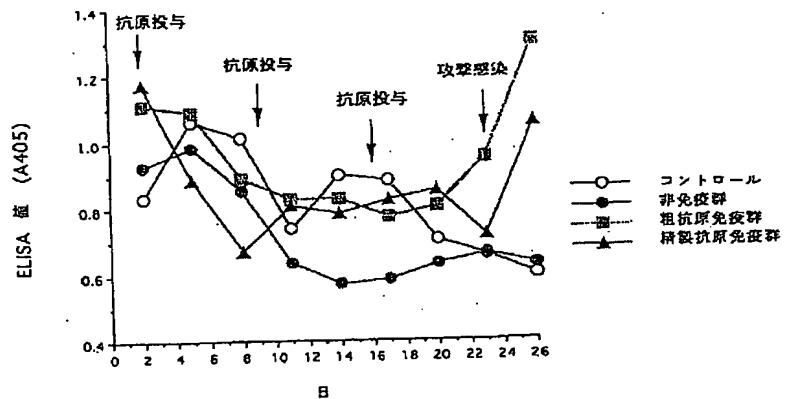
レーンA:分子量マーカー  
レーンB:SDS-PAGE  
レーンC:ウェスタンプロット

【図3】

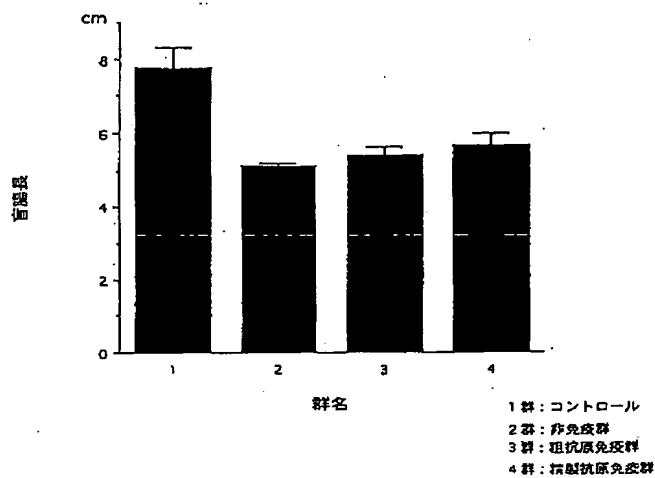


BEST AVAILABLE COPY

【図4】



【図5】



【図6】

